基础研究

芦丁对三甲基锡损害学习记忆功能的保护作用与拮抗突触囊泡蛋白表达下调有关

秦启忠[1],赵 奇[2],陈纯海[3],周 舟[3],余争平[3]

[1]重庆医科大学实验教学管理中心,重庆 401331;[2]重庆市疾病预防控制中心,重庆 400042;[3]第三军医大学劳动卫生学教研室,重庆 400038

摘要:目的 探讨芦丁对三甲基锡(Trimethyltin, TMT)损害小鼠学习记忆功能的保护作用及可能机制。**方法** 以6~9周龄雄性BALB/c小鼠为研究对象,随机分为生理盐水组(对照)、TMT组、TMT+芦丁组、芦丁组,每组各10只;建立TMT(2.25 mg/kg·B.W.)急性暴露模型,后两组芦丁(10 mg/kg·B.W.)预处理1周,均腹腔注射;TMT给药后24 h,Morris水迷宫测试各组的逃逸潜伏期,Western检测各组海马和皮层脑区突触囊泡蛋白(Synaptophysin, SYP)的表达情况。**结果** Morris水迷宫显示TMT给药后24 h,与TMT组相比,对照组和芦丁组及TMT+芦丁组逃逸潜伏期显著缩短(P<0.05),与芦丁组及对照组相比,TMT+芦丁组逃逸潜伏期无统计学意义(P>0.05);Western显示TMT给药后24 h,与对照组相比,TMT组海马和皮层脑区SYP蛋白表达显著降低(P<0.05);与TMT组相比,TMT+芦丁组海马和皮层脑区SYP蛋白表达显著升高(P<0.05),与芦丁组及对照组相比,TMT+芦丁组海马和皮层脑区SYP蛋白表达无统计学意义(P>0.05)。**结论** 芦丁预处理对TMT急性暴露损害小鼠学习记忆功能有保护作用,其保护作用可能与拮抗海马和皮层脑区SYP表达下调有关。

关键词:学习记忆;水迷宫;三甲基锡;突触囊泡蛋白;芦丁

Rutin protects against trimethyltin-induced learning and memory impairment in BALB/c mice by antagonizing down-regulated synaptophysin expression

QIN Qizhong[1], ZHAO Qi[2], CHEN Chunhai[3], ZHOU Zhou[3], YU Zhengping[3]

[1]Experiment Teaching Center, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China; [2]Chongqing Center for Disease Control and Prevention, Chongqing 400042, China; [3]Department of Occupational Health, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract: Objective To explore the protective effects of rutin against learning and memory impairment induced by trimethyltin (TMT) and investigate the possible mechanism. **Methods** Forty 6- to 9-week-old male BALB/c mice were randomized equally into saline group (control), TMT group, TMT+rutin group, and rutin group. Mouse models of learning and memory impairment were establish by acute TMT (2.25 mg/kg) exposure. In TMT+rutin and rutin treatment groups, the mice received intraperitoneal injection of rutin (10 mg/kg) for 1 week before TMT exposure. Twenty-four hours after TMT exposure, Morris water maze test was employed to test the escape latency of the mice, and the synaptophysin expression in the hippocampus and cortex were analyzed by Western blotting. **Results** Compared that in TMT group, the escape latency of the mice in water maze test was significantly shorter in the other 3 groups (P<0.05); the escape latency in TMT+rutin group was similar with that in the control and rutin groups (P>0.05). Western blotting showed significantly decreased synaptophysin expression in the hippocampus and cortex in TMT group (P<0.05); synaptophysin expression in TMT+rutin group increased significantly compared with that in TMT group (P<0.05) but showed no statistical significance from that in rutin and control groups (P>0.05). **Conclusion** Rutin pretreatment offers protective effect against TMT-induced learning and memory impairment in mice possibly by antagonizing decreased synaptophysin in the hippocampus and cortex.

Key words: learning and memory; morris water maze; trimethyltin; synaptophysin; rutin

三甲基锡(trimethyltin, TMT)是生产塑料稳定剂中伴生的一种副产物,广泛存在于生产和生活中。工业上,TMT主要存在于油漆、塑料等行业;农业上,TMT主要存在于杀虫剂、灭菌剂等。TMT可通过皮肤、黏膜、呼吸道、消化道等途径进入人体,并与血红蛋白有高度亲和力[1],它可以选择性作用于包括海马在内的边缘系统,其中造成神经系统损伤最突出的表现为学习记忆功能障碍[2]。突触囊泡蛋白(synaptophysin, SYP)是位于突触小泡表面及突触前膜含量丰富的膜蛋白[3],其结构含有缝隙样链接,参与包括单胺类、氨基酸类、胆碱能等多种神经递质的释放过程,并可调节突触可塑性[4];因此,SYP与学习记忆功能密切相关[5],但鲜见SYP蛋白表达在TMT致学习记忆功能障碍中的作用研究。芦丁是一种黄酮类化合物,它具有抗炎,抗氧化,清除自由基等生物学活性。文献报道,芦丁可改善TMT致学习记

收稿日期:2014-09-21

作者简介:秦启忠,硕士,实验师,E-mail: qqizhong@sina.com

忆功能障碍模型小鼠的空间记忆能力[6]。本文旨在探讨芦丁预处理对TMT致小鼠学习记忆功能障碍的保护作用及可能机制，为TMT的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

三甲基锡（TMT货号：146498，美国Sigma）；突触囊泡蛋白（SYP Ⅰ抗，货号：ab8049，美国Abcam）；β-actin Ⅰ抗（货号：A2228，美国Sigma）；IRDye 800CW驴抗小鼠荧光抗体（绿鼠Ⅱ抗，货号：926-32212，美国LI-COR）等。

1.2 主要仪器

Morris水迷宫视频跟踪系统（MT-200，中国成都泰盟）；多功能酶标仪（Infinite M200，瑞士Tecan）；Odyssey红外荧光6扫描成像系统（9120，美国LI-COR）等。

1.3 实验动物及分组

SPF级6~9周龄雄性BALB/c小鼠（第三军医大学实验动物中心提供，生产许可证：SYXK(渝) 2012-0002）。动物饲养温度：21±2 ℃，室内光照12 h（光照时间08：00~20：00），动物进食标准基础饲料，自由饮水。实验开始前于实验室适应性喂养1周。随机分为生理盐水（对照组）、TMT组、TMT+芦丁组、芦丁组，每组各10只，共40只。TMT的剂量参考文献[7]并通过预实验确定为2.25 mg/kg，1次性给药；后两组芦丁预处理1周（1次/d），芦丁的剂量参考相关文献为10 mg/kg[6]，各组均腹腔注射给药。

1.4 测试方法

1.4.1 水迷宫实验　Morris水迷宫参照文献[7-8]略改：直径120 cm，平台直径10 cm，水温保持24~26 ℃，用奶粉使水变得不透明，平台放在任意象限中央（与内环和外环相切）并在水下1~2 cm。按照小鼠的生活习性，水迷宫测试的时间在16：00~20：00进行。将小鼠放入水迷宫时，小鼠的头朝向水迷宫壁，4个象限的任意一个入水点均可。水迷宫实验前1 d让小鼠在水迷宫中（无平台）自由游1 min/次，共10次，以熟悉水迷宫环境。小鼠最大逃逸潜伏期为60 s，如果在60 s内小鼠没找到并爬上平台，则由实验员用小木棍引领并将其带上平台，并记录时间为60 s，否则记录相应时间x s，每次让小鼠在平台上待15 s。每只小鼠训练的时间间隔为15 min，1 d完成训练共8次[7]，每1次实验结束时将小鼠身上的水擦干并让其在取暖器旁取暖。

1.4.2 Western blot检测　参考文献[9]的方法略改：水迷宫实验后，断头处死小鼠，在冰上快速取出海马脑组织，提取总蛋白并测其浓度；经10% SDS-PAGE，80 V恒压分离，用湿转系统将目标蛋白转至NC膜上，电转150 mA；转印结束后，用5%脱脂奶粉封闭1 h；用TBST洗膜5 min×1次，孵育SYP Ⅰ抗（1∶1000）置于脱色摇床4 ℃过夜；次日，TBST洗膜5 min×4次，绿鼠Ⅱ抗（1∶5000）室温下避光孵育1 h，TBST洗膜5 min×4次；β-actin Ⅰ抗体室温1 h，TBST洗膜5 min×4次，绿鼠Ⅱ抗室温1 h，TBST洗膜5 min×4次，Odyssey红外荧光扫描成像系统软件对目标条带荧光光密度比较分析。

1.5 统计学处理

采用SPSS18.0统计软件分析数据，计量资料用均数±标准差表示，Morris水迷宫实验逃逸潜伏期和Western blot的结果先行方差齐性检验，组间比较行单因素方差分析（One-way ANOVA），两两比较用SNK法，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物的基本情况

BALB/c小鼠TMT（2.25 mg/kg）腹腔注射后24 h，TMT组进食与饮水量较对照组和芦丁组及TMT+芦丁组减少，身体有轻微的振颤，头部为最；TMT组活动量较其余3组减少，喜欢成对或成团聚集在一起；TMT组小鼠易被激怒，尾部有少许咬痕等。对照组和芦丁组及TMT+芦丁组进食、饮水量及活动量等表现类似，无明显异常表现。

2.2 水迷宫实验

TMT（2.25 mg/kg）腹腔注射后24 h，从水迷宫测试的逃逸潜伏期看（图1），连续8次水迷宫训练，经方差齐性检验，各组总体方差齐同，行单因素方差分析，组间差异有统计学意义（F=8.625，$P<0.01$）；SNK法比较结果显示：与TMT组相比，生理盐水组（对照）及芦丁组小鼠逃逸潜伏期从水迷宫训练第4次起显著缩短（$P<0.05$）；与TMT组相比，TMT+芦丁组小鼠逃逸潜伏期从水迷宫训练第5次起显著缩短（$P<0.05$）；与对照组和芦丁组相比，TMT+芦丁组小鼠逃逸潜伏期差异无统计学意义（$P>0.05$）。从搜索平台的策略上看（图2），TMT组小鼠在水迷宫边缘区域用时较多（外环用时平均占总收索时间的88.91%，中环+内环用时平均占11.9%），主要表现为边缘式；对照组和芦丁组小鼠经水迷宫训练第4次以后搜索平台时多在水迷宫中央区域（外环用时平均占总收索时间为39.10%和36.23%，中环+内环用时平均占60.9%和63.77%），主要表现为趋近式，而TMT+芦丁组小鼠在水迷宫训练到第5次后表现与对照组和芦丁组的搜索方式类似（外环用时平均占总收索时间为43.42%，中环+内环用时平均占56.58%）。

2.3 Western blot检测结果

TMT（2.25 mg/kg）腹腔注射后24 h，各组海马和皮层SYP蛋白表达情况（图3，4）。由表1可知，经方差齐性检验，各组总体方差齐同；行单因素方差分析显示，组

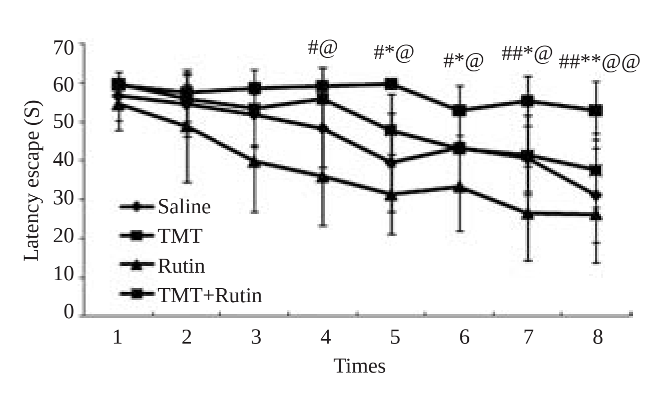


图1 各组连续8次水迷宫训练逃逸潜伏期的结果

Fig.1 Changes in escape latency in each group in consecutive 8 Morris water maze test. TMT groups *vs* TMT+Rutin groups, *P<0.05, **P<0.01; TMT groups *vs* Saline group, @P<0.05, @@P<0.01; TMT groups *vs* Rutin group, #P<0.05, ##P<0.01.

间差异有统计学意义(F=92.168,P<0.001)。SNK法结果显示:TMT组小鼠海马和皮层脑区SYP蛋白表达较对照组和芦丁组明显降低(P<0.05);与TMT组相比,TMT+芦丁组小鼠海马和皮层脑区SYP蛋白表达显著增加(P<0.05);与对照组及芦丁组相比,TMT+芦丁组小鼠海马和皮层脑区SYP蛋白表达差异无统计学意义(P>0.05)。

3 讨论

随着科技的迅猛发展,人们环保意识不断增强,无铅塑料稳定剂逐渐退出市场,含锡稳定剂透明效果及稳定性较好,其占市场份额越来越大。但生产含锡稳定剂如二甲基锡、三乙基锡等过程中会产生一种副产物即TMT。1978年,两位化学家因暴露TMT与DMT的混

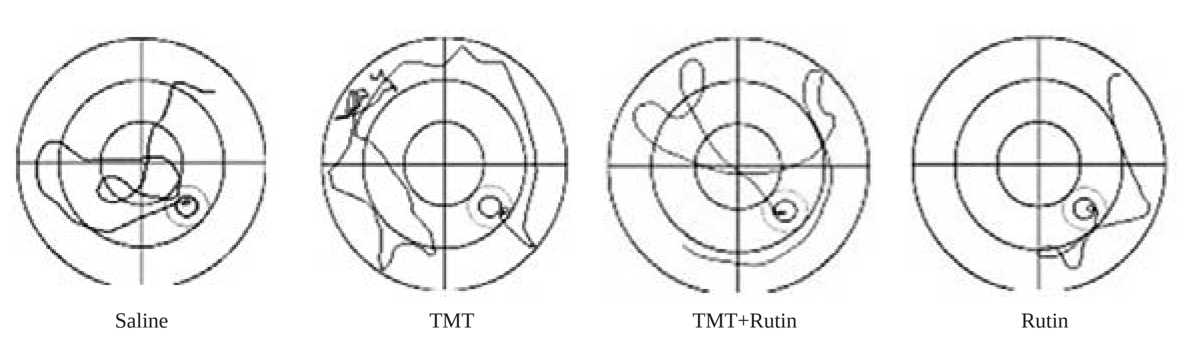


图2 各组水迷宫训练第8次的轨迹图

Fig.2 Trace diagram in each group in the 8th Morris water maze test.

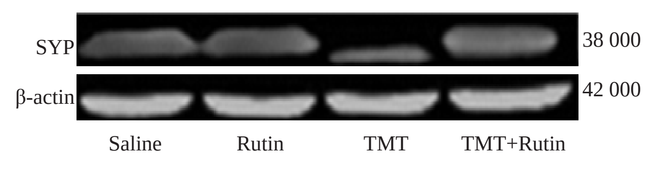


图3 Western blot检测各组海马脑区SYP蛋白表达的情况

Fig.3 Expression of synaptophysin protein in the hippocampus in each group detected by Western blotting.

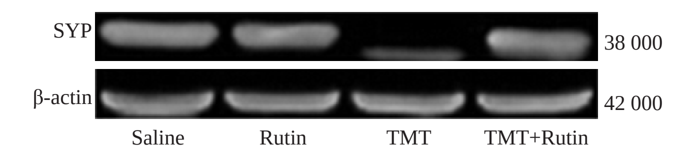


图4 Western blot检测各组皮层脑区SYP蛋白表达的情况

Fig.4 Expression of synaptophysin protein in the cortex in each group detected by Western blotting.

表1 Western blot检测各组海马和皮层到SYP蛋白表达

Tab.1 Synaptophysin expression in the hippocampus and cortex in each group detected by Western blotting (n=6)

Group	SYP/β-actin	
	Hippocampus	Cortex
Saline	0.985±0.086	0.989±0.092
Rutin	0.996±0.062	0.991±0.081
TMT	0.625±0.126*	0.582±0.118*
TMT+Rutin	0.972±0.098	0.986±0.076

*P<0.05 *vs* saline group.

合物后,表现出一系列中枢神经系统中毒症状[10];以及在生活中不断发生TMT中毒事件,多为急性中毒,并且目前还没有针对TMT中毒的特效解毒剂,从而引起学者们的广泛关注[11]。当前,有人认为TMT可能与神经退行性疾病发生有关[12]。神经退行性疾病突出的表现为学习记忆功能障碍,其确切机制尚未明了。因此,本研究建立急性TMT暴露模型,探讨TMT致学习记忆功能的影响及与学习记忆功能密切相关的SYP蛋白表达情况,并研究芦丁预处理后TMT致小鼠学习记忆功能的影响及SYP蛋白的表达情况,从行为学及分子生物学层面探讨TMT致学习记忆功能障碍的可能机制,为TMT中毒的有效防治提供科学依据。

小鼠TMT(2.25 mg/kg)暴露后24 h,其行为方面表现出有轻微的神经中毒症状,这与前期报道一致[1,7],而芦丁预处理1周后再给予TMT,小鼠无明显异常表现,提示芦丁预处理可能有预防作用。水迷宫试验作为公认的行为学评价工具,广泛应用于行为、认知功能等

方面的研究,因研究对象及建立模型的差异,其训练方式也有所不同。文献报道TMT暴露后其逃逸潜伏期在168 h内可恢复至正常,但其组织损伤尚未修复,因此本研究参考文献在1 d内完成水迷宫测试[7]。经水迷宫测试,TMT组小鼠较对照组小鼠逃逸潜伏期显著延长,并且其搜索策略为边缘式,而TMT+芦丁组和对照组及芦丁组小鼠在水迷宫训练第5次后表现类似,搜索策略为趋近式,这提示TMT急性暴露已导致小鼠学习记忆功能障碍。TMT+芦丁组较TMT组小鼠水迷宫逃逸潜伏期显著缩短,搜索策略也更为科学;TMT+芦丁组与对照组及芦丁组相比,其逃逸潜伏期差异无统计学意义,搜索策略类似,这提示芦丁预处理对TMT致小鼠学习记忆功能障碍有改善作用,这与文献[6]一致。

小鼠TMT(2.25 mg/kg)暴露后24 h,Western结果显示TMT组小鼠海马和皮层脑区SYP蛋白表达较对照组显著降低;结合水迷宫测试,TMT组小鼠逃逸潜伏期较对照组显著延长。芦丁预处理1周再给予TMT,结果提示芦丁预处理可拮抗TMT致小鼠海马和皮层脑区SYP蛋白表达降低;TMT+芦丁组小鼠较对照组和芦丁组小鼠海马和皮层脑区SYP蛋白表达略为降低,但差异无统计学意义;经水迷宫测试,芦丁预处理可改善TMT致小鼠逃逸潜伏期显著延长的情况,并且与对照组及芦丁组小鼠逃逸潜伏期差异无统计学意义,这提示芦丁对TMT致小鼠学习记忆功能障碍的保护作用与拮抗海马和皮层脑区SYP蛋白表达下调有关。文献报道SYP广泛表达于突触前膜和突触小泡[13],因其特殊结构,可通过胞吞或胞吐等方式参与神经递质的释放过程[14],并可调节突触可塑性[4];因此,SYP表达含量变化与学习记忆功能密切相关[15-16]。目前,关于TMT导致学习记忆功能障碍发生的机制研究主要有凋亡、炎性反应、氧化损伤、钙离子通道、神经递质释放[17-19]等,涉及多条信号通路[20],但TMT是如何导致海马和皮层等脑区SYP蛋白含量降低,而引起学习记忆功能障碍的发生,其确切机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Brown AW, Aldridge WN, Street BW, et al. The behavioral and neuropathologic sequelae of intoxication by trimethyltin compounds in the rat[J]. Am J Pathol, 1979, 97(1): 59-82.

[2] Earley B, Burke M, Behavioral LB. Biochemical and histological effects of trimethyltin (TMT) induced brain damage in the rat[J]. Neurochem Int, 1992, 21(3): 351-66.

[3] Wiedenmann B FW, Localization OS. An integral membrane glycoprotein of Mr 38 000 characteristic of presynaptic vesicles[J]. Cell, 1985, 41(3): 1017-28.

[4] Kwon SE, Chapman ER. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons[J]. Neuron, 2011, 70(5): 847-54.

[5] Hayashi ML, Choi SY, Rao BS, et al. Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice[J]. Neuron, 2004, 42(5): 773-87.

[6] Koda T, Kuroda Y, Imai H. Protective effect of rutin against spatial memory impairment induced by trimethyltin in rats[J]. Nutrition Research, 2008, 28(9): 629-34.

[7] Halladay AK, Wilson DT, Wagner GC, et al. Trimethyltin-induced alterations in behavior are linked to changes in PSA-NCAM expression[J]. Neurotoxicology, 2006, 27(2): 137-46.

[8] Kee N, Teixeira CM, Wang AH, et al. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus[J]. Nat Neurosci, 2007, 10(3): 355-62.

[9] Zc X, ChenYM, XuP, et al. Epileptiform discharge upregulates p-ERK1/2, growth-associated protein 43 and synaptophysin in cultured rat hippocampal neurons[J]. Seizure, 2009, 18(10): 680-5.

[10] Fortemps E, Amand G, Bomboir A, et al. Trimethyltin poisoning. Report of two cases[J]. Int Arch Occup Environ Health, 1978, 41(1): 1-6.

[11] Tang X, Yang X, Lai G, et al. Mechanism underlying hypokalemia induced by trimethyltin chloride: Inhibition of H^+/K^+-ATPase in renal intercalated cells[J]. Toxicology, 2010, 271(1/2): 45-50.

[12] Corvino V, Marchese E, Michetti F, et al. Neuroprotective strategies in hippocampal neurodegeneration induced by the neurotoxicant trimethyltin[J]. Neurochem Res, 2013, 38(2): 240-53.

[13] Rustom A, Saffrich R, Markovic I, et al. Nanotubular highways for intercellular organelle transport [J]. Science, 2004, 303(5660): 1007-10.

[14] Stevens RJ, Akbergenova Y, Jorquera RA, et al. Abnormal synaptic vesicle biogenesis in Drosophila synaptogyrin mutants [J]. J Neurosci, 2012, 32(50): 18054-67.

[15] Ya BL, Liu WY, Ge F, et al. Dietary cholesterol alters memory and synaptic structural plasticity in young rat brain [J]. Neurol Sci, 2013, 34(8): 1355-65.

[16] Parihar VK, Limoli CL. Cranial irradiation compromises neuronal architecture in the hippocampus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(31): 12822-7.

[17] Ravanan P, Harry GJ, Awada R, et al. Exposure to an organometal compound stimulates adipokine and cytokine expression in white adipose tissue[J]. Cytokine, 2011, 53(3): 355-62.

[18] Qu M, Zhou Z, Chen C, et al. Lycopene protects against trimethyltin-induced neurotoxicity in primary cultured rat hippocampal neurons by inhibiting the mitochondrial apoptotic pathway[J]. Neurochem Int, 2011, 59(8): 1095-103.

[19] Fabrizi C, De Vito S, Somma F, et al. Lithium improves survival of PC12 pheochromocytoma cells in high-density cultures and after exposure to toxic compounds [J]. Int J Cell Biol, 2014, 2014: 135908. doi: 10.1155/2014/135908.

[20] Kim BK, Tran HY, Shin EJ, et al. IL-6 attenuates trimethyltin-induced cognitive dysfunction via activation of JAK2/STAT3, M1 mAChR and ERK signaling network[J]. Cell Signal, 2013, 25(6): 1348-60.

(编辑:黄开颜)